



Bel BioLab

## Протокол рутинной амплификации с использованием Taq ДНК полимеразы (с детекцией продуктов амплификации с помощью геля электрофореза).

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть разморожены и хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 25 мкл. Можно также проводить ПЦР в меньших объемах. Для этого уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества.

1. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки:

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
10-кратный буфер А	2.5 μl	1-кратный
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1 -2,5	2 – 5 mM
дНТФ 10 mM	0,5	0,2 mM
Прямой праймер (50 μM)*	0,2 μl	0,4 μM
Обратный праймер (50 μM)	0,2 μl	0,4 μM
ДНК матрица	Определяется пользователем	1 pg –10 ng плазмидной, фаговой или ВАС ДНК; 0,1-100 ng геномной ДНК
Taq(5 U/μl)	0,2 μl	0,04 U/μl
H <sub>2</sub> O	Довести реакционную смесь до 25 мкл	

\* - Оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,2 – 1 μM.

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.
3. Условия проведения ПЦР

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Начальная денатурация	95°C	2 мин
25-35 циклов	95°C	10 секунд
	55°C – 67 °C	10 секунд
	72°C	30-60 секунд на 1 000 п.о.*
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

\* Длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 5 000 п.о.

4. После окончания амплификации внесите в пробу буфер для загрузки образка в гель и нанесите 3-10 мкл ПЦР смеси в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.